

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Boleias biológicas
Alterações na comunidade parasitária de lagomorfos do
noroeste italiano pela introdução do *Sylvilagus floridanus*

Ana Daniela Ferreira Andrade

Orientador:
Prof. Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino

Co-Orientador:
Prof. Doutor Pier Giuseppe Meneguz

Porto 2014

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Boleias biológicas
Alterações na comunidade parasitária de lagomorfos do
noroeste italiano pela introdução do *Sylvilagus floridanus*

Ana Daniela Ferreira Andrade

Orientador
Prof. Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino

Co-Orientador
Prof. Doutor Pier Giuseppe Meneguz

Porto 2014

Resumo

A fauna de um território é uma componente ambiental em constante mutação, que ao longo do tempo sofre diversos processos de evolução e extinção. A mão humana tem uma influência ativa nestes eventos, interferindo por vezes no sentido da sua gestão e conservação, mas também através de acções que podem conduzir à diminuição da sua biodiversidade. Neste estágio foi possível acompanhar a actividade de gestão e vigilância faunística em território alpino. Porém, o principal trabalho desenvolvido foi um estudo parasitológico numa comunidade lagomórfica do noroeste italiano, após a introdução humana de uma espécie hospedeira alóctone – *Sylvilagus floridanus*.

Com o objectivo de descrever a comunidade parasitária, foram analisados os conteúdos intestinais de quatro hospedeiros: três autóctones (*Oryctolagus cuniculus*, *Lepus europaeus* e *Lepus timidus*) e um alóctone (*Sylvilagus floridanus*). Verificou-se que, em zonas onde os hospedeiros autóctones não entram em contacto com *S. floridanus*, a constituição da parasitofauna não sofreu alterações. Por outro lado, em zonas onde as espécies habitam em simpatia, verificou-se uma partilha de parasitas entre os hospedeiros, e uma substituição dos parasitas típicos pelos alóctones. Na tentativa de perceber se os hospedeiros autóctones exercem influência na adaptação dos novos parasitas, utilizou-se como caso de estudo a espécie alóctone *Trichostrongylus calcaratus*, nemátode isolado nos três hospedeiros coabitantes. Foram realizadas medições dos comprimentos do corpo e estruturas reprodutivas, no caso dos machos, e contagem de número de ovos, no caso das fêmeas, como parâmetros de avaliação da fitness parasitária. Verificou-se que *T. calcaratus*, ainda que melhor adaptado à sua espécie nativa *S. floridanus*, encontra nos hospedeiros autóctones um ambiente favorável ao seu desenvolvimento.

Novos estudos seriam importantes no sentido de avaliar um possível efeito de competitividade entre lagomorfos mediada pela comunidade parasitária.

Agradecimentos

Porque este estágio não seria possível sem o contributo de certas pessoas, quero agradecer:

Ao Prof. Dr. Augusto Faustino, pela oportunidade de realizar este estágio em Turim, por todos os conselhos e sugestões pertinentes, pela paciência, pela simpatia com que sempre me recebe, por incentivar a minha autonomia e por me mostrar o quão largos podem ser os horizontes, muito obrigada;

Ao Prof. Dr. Pier-Giuseppe Meneguz, por me ter aceitado e acolhido tão bem, me integrar na sua equipa de trabalho e por se lembrar sempre de mim quando surgia a oportunidade de realizar uma nova actividade, grazie mille;

Ao Prof. Dr. Paolo Tizzani, por tudo o que me ensinou, todo o apoio, todos os conselhos, por ser incansável, pela positividade que me transmitiu nos momentos mais complicados e pelo exemplo de dedicação e boa disposição com que trabalha todos os dias, grazie mille;

A todo o pessoal do Comprensorio Alpino e do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Veterinária da UNITO, pelo carinho com que me receberam e me integraram no departamento e num país e cultura completamente novos para mim, pela ajuda no laboratório e por todas as “pausa pranzo” repletas de gargalhadas, pelos laços de amizade que criámos, grazie a tutti.

E porque o meu percurso até aqui não teria o mesmo sabor se não fossem eles agradecer:

Aos amigos que o ICBAS me fez conhecer, aqueles que comigo partilharam esta viagem, com quem cresci e vivi momentos de loucura, tristeza, nervosismo, euforia e pura felicidade;

Aos meus amigos de longa data, àqueles que partilham comigo a paixão pela dança que tantas vezes serviu de carregador de energia; àqueles que me acompanham desde os tempos de escola, e que, independentemente do rumo dos nossos trilhos, sei que há sempre um atalho que nos permite estar juntos (mesmo se chegarmos com 30 min de atraso);

À minha família, porque acredita em mim e no meu sucesso, aos que vibram ao ver-me terminar mais esta etapa, e aos que partiram mais cedo, demasiado cedo, mas que deixaram comigo a sua ternura e a força de seguir em frente;

À Princesa e ao Dimitri, fiéis companheiros de infância, em parte responsáveis por esta escolha profissional, cujos olhares vou guardar sempre na memória;

A ti pai e a ti mãe, porque sem vocês eu não estaria aqui, nem seria quem sou hoje. Obrigada. Esta conquista também é vossa.

Índice

Resumo	iii
Agradecimentos	iv
Índice	v
1. Introdução geral	1
2. Consequências da introdução de uma espécie alóctone.....	2
2.1 Introdução.....	2
2.2 Hospedeiros em estudo	4
2.3. A comunidade parasitária típica dos hospedeiros em estudo.....	7
2.4. Perspectiva evolutiva da relação hospedeiro-parasita e fitness parasitária	8
2.5. Materiais e métodos.....	10
2.6. Resultados	13
2.6.1 Descrição da comunidade parasitária gastro-intestinal nos lagomorfos.....	13
2.6.2 Adaptação morfo-funcional de <i>T. calcaratus</i> ao hospedeiro	17
2.7. Discussão	20
2.7.1. A comunidade parasitária.....	20
2.7.2. Adaptação morfo-funcional de <i>T. calcaratus</i>	22
2.8 Conclusão.....	24
3. Outras actividades realizadas	24
4. Conclusão final	25
5. Bibliografia	26
6. Anexos	31

1. Introdução geral

O estágio curricular que consta neste relatório teve como principal objectivo permitir a possibilidade de trabalhar na área da fauna selvagem e desenvolver um projecto científico no sentido da sua conservação. O estágio decorreu em Itália, na província de Turim, e teve lugar em dois locais distintos mas que colaboram mutuamente. O primeiro mês foi passado no Comprensorio Alpino CN2, uma estrutura de apoio à comunidade sem fins lucrativos, que é responsável pela gestão e vigilância faunística, ambiental e cinegética da região do Valle Varaita. O restante tempo de estágio teve lugar na Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino (UNITO), no Departamento de Parasitologia e Doenças Parasitárias, onde foi levado a cabo um estudo sobre as consequências da introdução de uma espécie alóctone, tema tratado com mais profundidade neste relatório.



Figura 1. Exemplos de uma espécie pertencente à fauna alpina, o corso (*Capreolus capreolus*) – duas fêmeas e um macho ao centro.

Fonte: <http://www.phototrapcam.com/>

2. Consequências da introdução de uma espécie alóctone

2.1 Introdução

As invasões biológicas, isto é, a expansão provocada pelo Homem de espécies animais ou vegetais fora da sua área de presença natural, representa actualmente uma das principais ameaças à biodiversidade, segunda causa após a destruição de habitats (IUCN 2000; Mack *et al.* 2000). Quando uma espécie alóctone é introduzida num habitat, nem sempre o verdadeiro risco que esta apresenta para a biodiversidade local é imediatamente evidente. Para as espécies autóctones geneticamente próximas, esta introdução pode constituir uma ameaça não só pela competitividade pelo alimento, pelo território, transporte de novos microrganismos mas também pela introdução de novas espécies parasitárias que acompanham este hospedeiro exótico.

Hospedeiro e parasita vivem intimamente ligados numa interacção trófica que influencia notavelmente a comunidade ecológica. Deste modo, se por um lado a espécie parasitária é introduzida na composição da comunidade, na biodiversidade e na evolução, por outro é responsável pela redução da aptidão do hospedeiro, seja a nível individual como populacional (Hudson *et al.* 2002). Por outras palavras, os parasitas são capazes de alterar as trocas energéticas, resultando que a energia acumulada não possa ser investida unicamente em operações de reprodução e sobrevivência, mas deverá ser em parte investida numa defesa activa no confronto com a infestação parasitária (Tizzani 2007). Por este motivo, os estudos ecológicos de populações de animais vertebrados devem incluir estudos ao nível parasitário, uma vez que as comunidades parasitárias influenciam de maneira directa a fitness das populações hospedeiras, e deste modo as densidades populacionais (Albon *et al.* 2002).

Na década de 60 do século passado, perante uma diminuição do número de lebres devido a uma alteração do sistema de agricultura tradicional para um modelo de agricultura intensiva, foi introduzida com finalidade venatória na província de Turim, noroeste de Itália, um lagomorfo, proveniente da América do Norte e Central: o coelho-da-Florida, *Sylvilagus floridanus* (Mussa 1996). Nos anos seguintes, foram libertados exemplares em diversas outras zonas, o que culminou numa rápida expansão territorial e demográfica (Silvano *et al.* 2002, Bertolino *et al.* 2011) (figura 2). A introdução deste lagomorfo não se limita porém à introdução de uma nova espécie exótica, mas numa perspectiva mais abrangente, representou a introdução de diversas espécies parasitárias, completamente novas para este habitat. Este facto pode ter implicado uma alteração da comunidade parasitária autóctone. Apesar de alguns estudos ecológicos terem demonstrado que, em áreas com uma boa diversidade ambiental, há ausência de competição trófica entre o coelho-da Florida e a lebre-comum (Rosin *et al.* 2008),

coloca-se a hipótese de que os novos parasitas introduzidos por esta espécie possam exercer uma acção de “competição mediada pelo parasita” (Price *et al.* 1987). Para uma espécie hospedeira, um parasita não específico com o qual desenvolveu uma imunidade parcial é uma poderosa arma competitiva (Price *et al.* 1987).

Foi neste sentido que este trabalho foi conduzido, com o objectivo de avaliar a comunidade parasitária dos lagomorfos no noroeste de Itália, quer em condições de simpatia com o alóctone coelho-da-Florida, quer em áreas onde este não se encontra presente.

Um segundo objectivo, definido perante os resultados obtidos e tendo a espécie exótica *Trichostrongylus calcaratus* como caso de estudo, foi perceber se esta se está a adaptar às novas espécies hospedeiras, as espécies nativas italianas, e desta forma potencialmente vir a substituir a comunidade parasitária autóctone.

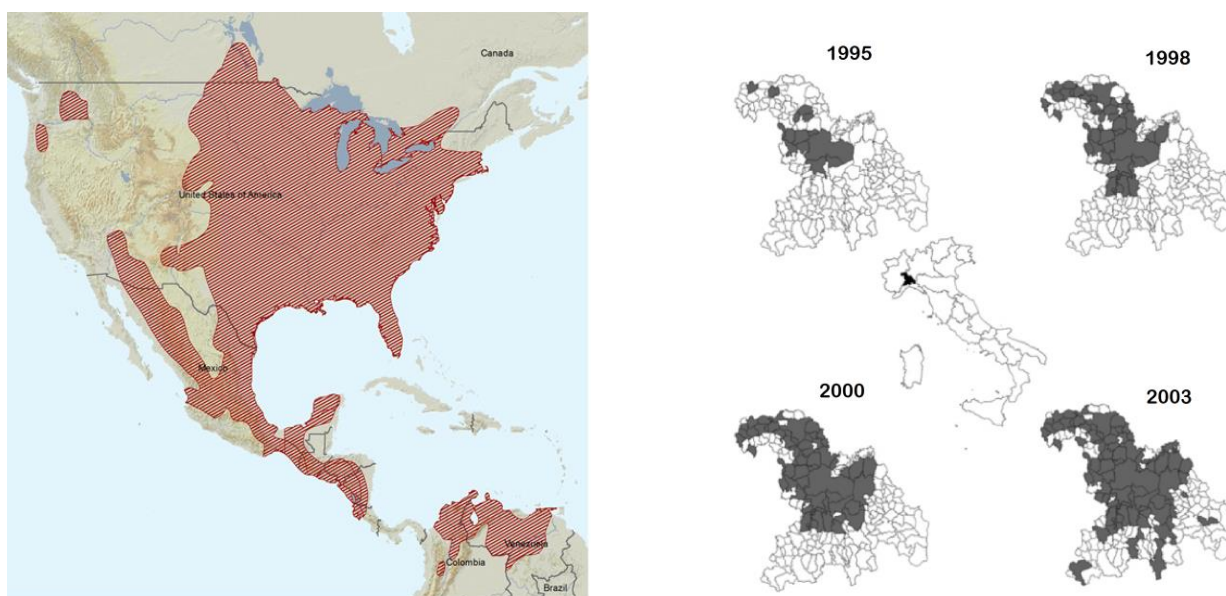


Figura 2. Território de origem de *S. floricatus* a vermelho (à esquerda) e expansão do território onde *S. floricatus* se encontra presente na província de Alessandria, Itália, desde o ano de 1995 até 2003 a negro (Bertolino *et al.*, 2011) (à direita).

2.2 Hospedeiros em estudo

Neste capítulo, são sumariadas algumas das características biológicas das quatro espécies hospedeiras estudadas: as três espécies autóctones italianas (*Oryctolagus cuniculus*, *Lepus europaeus* e *Lepus timidus*) e a espécie introduzida (*Sylvilagus floridanus*).

***Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758)**

O coelho-europeu ou coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*) é a única espécie do seu género *Oryctolagus*, ancestral a todos os coelhos domésticos. Após ter estado confinada à Península Ibérica e pequenas áreas francesas e do noroeste africano durante a idade do gelo, esta espécie dispersou-se por todo o mundo graças à sua adaptabilidade e à mão humana, existindo em estado selvagem em todos os continentes excepto Ásia e Antárctida (Gibb 1990). O seu habitat é normalmente em zonas arbustivas, ideais para



Figura 3. Coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*)

Fonte: <http://olhares.sapo.pt/>

encontrar esconderijos, e também zonas de floresta, evitando áreas abertas, onde se encontra desprotegido perante predadores. A actividade humana, em especial a agricultura, contribuiu inadvertidamente para a colonização de novas áreas próximo de povoações. Habita em tocas, onde passa a maior parte do tempo quando não está a alimentar-se. É um animal gregário e territorial. Quando as condições e o alimento o permitem, prefere viver em colónias, de 6 a 10 adultos de ambos os sexos. Estas colónias têm hierarquias bem definidas, que definem qual o macho que terá acesso preferencial às fêmeas. A territorialidade é mais evidente durante as épocas de acasalamento (Nowak 1999). Num estudo realizado no Norte da Itália, a densidade desta espécie foi calculada como sendo de 113 animais por km² (Pèrez 2008). Este animal pesa cerca de 1,5 a 2,5kg e mede entre de 38 e 50 cm de comprimento. A pelagem dorsalmente é acinzentada, com laivos de preto, castanho e por vezes vermelho. Ventralmente o corpo é cinzento pálido e a cauda é branca. Não são invulgares indivíduos melanísticos (Macdonald 1984). Comparativamente à *L. europaeus*, as orelhas são mais curtas e os membros posteriores menos poderosos. Alimenta-se de diferentes tipos de ervas, folhas, raízes e rebentos. Partilha com os restantes lagomorfos a prática da cecotrofia, ou seja, tem necessidade de ingerir os cecotrofos (fezes diurnas) com o objectivo de obter o máximo de valor nutricional. O seu ceco é bem desenvolvido, funcionando como grande câmara de fermentação onde a flora bacteriana produz nutrientes essenciais que serão absorvidos aquando da segunda passagem pelo sistema digestivo.

***Lepus europaeus* (Pallas,1778)**

A espécie *Lepus europaeus*, a lebre-comum ou lebre-europeia, é um lagomorfo da família do coelho, porém de um género diferente, que faz parte da fauna selvagem da região Paleártica. Este animal apresenta um corpo delgado com membros posteriores munidos de uma forte musculatura, perfeitamente adaptados à corrida e ao salto; pavilhão auricular de grande área, extremamente móvel e longo; olhos grandes, redondos e



Figura 4. Lebre-comum (*Lepus europaeus*)
Fonte: www.birdsphotographer.com

ligeiramente salientes, em posição lateral, que lhe permitem um amplo campo de visão; cauda curta e enrolada dorsalmente; superfície palmar e plantar recobertas de pêlo; pelagem de cor fulvo-acinzentada e negra no dorso, mais clara entre as orelhas e no focinho, amarela-ferrugem no peito, branca na parte ventral da cauda e negra na dorsal. A muda de pêlo dá-se duas vezes por ano (época de Fevereiro-Março e Outubro), com diferença de cor pouco evidente entre pelagens. Nesta espécie não existe dimorfismo sexual evidente (Amori *et al.* 2008). É estritamente herbívoro, alimentando-se essencialmente de gramíneas na Primavera e erva seca, sementes e rebentos de cereais no inverno (Amori *et al.* 2008). A componente arbustiva assume especial relevância na dieta invernal, sendo que em presença de neve pode representar até 70% da sua dieta.

A lebre europeia é uma espécie que facilmente se adapta a diferentes habitats. Normalmente encontra-se em espaços de pradaria e estepes mas também ambientes agrícolas (Meriggi & Alieri 1989). Ao contrário dos coelhos, não habita em tocas, contando com a sua coloração mimética e adoptando uma posição encolhida para se esconder de predadores. A abundância desta espécie está directamente relacionada com a fertilidade dos terrenos e a actividade agrícola (Trocchi & Riga 2005). Assim sendo, no arco alpino, a sua abundância em zonas de bosque é reduzida, preferindo zonas planas e colinas, não ultrapassando uma altitude de cerca de 2000 metros. A densidade desta espécie varia consideravelmente consoante a estação do ano (máxima no final do Verão e início de Inverno), influenciada por factores biológicos e ambientais, que condicionam a utilização do território. A partir do ano de 1960, verificou-se um declínio populacional da espécie um pouco por toda a Europa, incluindo Itália, que se deveu a uma redução qualitativa e quantitativa de habitats favoráveis, como consequência de modernos meios de cultivo (Smith *et al.* 2005), bem como a um aumento da actividade cinegética.

***Lepus timidus* (Linnaeus, 1758)**

A lebre-alpina (*Lepus timidus*) encontra-se distribuída desde o nordeste europeu até à Sibéria de leste, com alguns núcleos isolados nos Alpes, Escócia e Irlanda. Em Itália está presente a *subespécie* *Lepus timidus varronis*. Tem uma forma alongada, com orelhas do mesmo comprimento da cabeça. Cauda curta, membros posteriores mais longos que os anteriores. As superfícies palmares e plantares são abundantemente recobertas de pêlo. Esta característica, juntamente com a capacidade de formar um largo ângulo entre os dedos, permite-lhe movimentar-se sem dificuldade sobre a neve.

Esta espécie apresenta um dimorfismo cromático estacional. Durante o Verão a pelagem é cinza-acastanhado, com pescoço castanho uniforme e garupa tendencialmente negras. No Inverno, de modo a mimetizar-se com o ambiente, o seu manto torna-se branco ou cinzento muito claro, com excepção da extremidade das orelhas que são negras (Amori *et al.* 2008). A muda primaveril inicia a meio de Março e é completa a Maio/Junho. Já a muda invernal decorre em duas fases: uma primeira em Outubro/Novembro com a formação de uma capa acinzentada e de Dezembro a Abril, quando o manto cinzento é completamente substituído pelo branco. Os factores que influenciam esta muda são a temperatura e o fotoperíodo (Kuderling *et al.* 1979), sendo que o período de persistência deste manto invernal é proporcional à altitude (Lind 1961), que na subespécie *L. t. varonis* varia aproximadamente entre os 1200 aos 3500 metros. Aqui vive em ambiente de tundra alpina e de altos prados. No Verão esconde-se entre as plantas arbustivas e rochas, enquanto que no Inverno escava túneis na neve, deixando-se cobrir por esta. Dimorfismo sexual fenotípico não está presente. A estação reprodutiva é relativamente breve (de Abril a Agosto) e varia segundo a latitude e altitude (Trocchi & Riga 2005). A densidade populacional desta espécie no arco alpino Lombardo foi registada de 1 a 2 indivíduos por 100 hectares, chegando aos 6 a 4 em áreas óptimas (Tosi 1998).



Figura 5. Lebre – alpina (*Lepus timidus*): da esquerda para a direita, manto de Verão, manto em época de transição e manto invernal.

Fontes: <http://www.planet-mammiferes.org/>; <http://www.biolib.cz/>; <http://lis-upmc.snv.jussieu.fr/>

***Sylvilagus floridanus* (Allen 1890)**

A espécie *Sylvilagus floridanus*, em português coelho-da-Florida, é originária na América do Norte e América Central, que foi introduzida em Itália após o ano de 1966, com fins cinegéticos. As suas dimensões são semelhantes às do coelho selvagem; porém é ainda mais pequena, com orelhas mais curtas e recolhidas. A pele é grossa, o dorso e a cauda dorsalmente cinzento-acastanhados, pescoço cor de ferrugem com o abdómen e parte ventral da cauda brancos.

Os membros posteriores são esbranquiçados, com as superfícies plantares negras, e quanto às orelhas são enegrecidas na parte externa e têm o bordo interno branco. A maturidade sexual é atingida precocemente: as fêmeas podem ser férteis aos 3 meses de idades, enquanto que os machos são maduros ao ano (Tocchi & Riga 2005). A estação reprodutiva é regulada pelo fotoperíodo e também pela latitude, e em média cada fêmea tem 5 partos por estação reprodutiva (Chapman *et al* 1980).

Ambientes bem diversificados e ricos como são os ecótonos (áreas de transição entre dois ambientes), constituem o habitat ideal para esta espécie. A sua alimentação baseia-se em pastagens, cereais e gramíneas (Amori *et al.* 2008). Apesar de poder ser encontrada até altitudes de 1500m, em Itália coloniza principalmente áreas de planície e pequenas colinas ricas em vegetação natural (Mussa *et al.* 1991). Relativamente à densidade populacional, estudos nos Estados Unidos apontam para números que rondam os 8-10 indivíduos por hectare. Na província italiana de Alessandria, segundo Silvano *et al.* 2000, a densidade ronda os 25-28 indivíduos por 100 hectares.



Figura 6. Coelho-da-Florida (*Sylvilagus floridanus*)

Fonte: www.flickr.com

2.3. A comunidade parasitária típica dos hospedeiros em estudo

Neste capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica das espécies parasitárias características dos quatro lagomorfos em estudo, dando especial ênfase aos nemátodes gastrointestinais mais frequentes em cada uma. Os estudos descritos até à data tiveram lugar não só em diversos países europeus mas também na Austrália, Chile e Estados Unidos, e compreendem dados relativos a diferentes estações do ano. Tendo estes aspectos em consideração, esta revisão serve principalmente para descrever a comunidade parasitária tipicamente característica destes animais.

Na lebre-europeia foram descritas 8 espécies de céstodes, 3 de trematódes e 9 de nemátodes. O nemátode gastro-intestinal mais frequentemente encontrado, descrito em 15 dos

17 trabalhos considerados, é o *Trichostrongylus retortaeformis* no intestino, com uma prevalência compreendida entre os 6,76% (Dubinsky, 2010) e os 100% (Irvin, 1967). A este segue-se o parasita gástrico *Graphidium strigosum* e os parasitas intestinais, *Passarulus ambiguus* e *Trichuris leporis*. No trabalho de Tizzani (2011), realizado na mesma zona de estudo italiana, foi reportada pela primeira vez a espécie *Obeliscoides cuniculi* no estômago da lebre-comum.

Na *Lepus timidus*, estão descritas 8 espécies de céstodes, 3 de trematódes e 5 de nemátodes, nomeadamente, *T. retortaeformis*, *T. instabilis*, *G. strigosum*, *P. ambiguus* e *T. leporis* (Soveri 1992). A subespécie existente na cordilheira alpina, *Lepus timidus varronis*, apresenta uma riqueza parasitária muito baixa, o que pode dever-se à dificuldade de obtenção de amostras, uma vez que o seu habitat é de difícil acesso, a uma baixa densidade populacional (Lanfranchi 1995) e a uma relação negativa da riqueza parasitária com o aumento da altitude (Tizzani 2007). Os poucos estudos desenvolvidos (Meneguz e Rossi 1988, Meneguz 1989) descrevem a espécie nemátode *Trichuris sylvilagi* e os céstodes *Mosgovoyia pectinata* e *Anaplocephala wimerosa*.

Relativamente à fauna parasitária de *Oryctolagus cuniculus*, nos 11 trabalhos revistos, 11 espécies de céstodes foram descritas, 2 de trematódes e 8 de nemátodes. Os nemátodes mais frequentemente descritos no coelho-bravo a nível intestinal são o *P. ambiguus* e *T. retortaeformis* e a nível gástrico *G. strigosum* (Boag 1984; Molina 1999; Foronda 2005; Eira 2007). Conjuntamente com as 2 últimas espécies referidas foram ainda descritos *T. leporis* e o parasita respiratório *Linguatua serrata* no único estudo realizado na região de Turim (Rossi 1986).

As espécies descritas na *Sylvilagus floridanus* na sua localização de origem incluem 11 cestodes, 1 tremátode e 10 nemátodes, entre os quais *P. nonanulatus*, *Physaloptera spp*, *Trichostrongylus affinis*, *T. calcaratus* e *Trichuris leporis*. Em Itália, os dados relativos à fauna parasitária desta espécie são escassos. Porém no trabalho de Tizzani (2000), foram isoladas as espécies de nemátodes *Obeliscoides cuniculi*, *Passarulus nonnanulatus*, *T. calcaratus* e ainda 2 céstodes.

2.4. Perspectiva evolutiva da relação hospedeiro-parasita e fitness parasitária

Parasita e hospedeiro evoluem e adaptam-se juntos ao longo do tempo, respondendo reciprocamente às solicitações evolutivas de cada um (Stennsseth e Maynard-Smith 1984), processo denominado de co-especiação (Paterson e Banks 2001) ou co-evolução (Thompson 1994). Deste modo, os parasitas são um dos componentes fundamentais da ecologia de comunidade, contendo informação útil acerca das características de um ecossistema e

permitindo a formulação de hipóteses evolutivas e de reconstituição da história biogeográfica e filogenética do próprio hospedeiro (Marcogliese & Cone 1997).

Muitas vezes, um hospedeiro é parasitado por diversas espécies (infestações mistas) que utilizam os mesmos recursos de nutrientes e espaço, numa competição assimétrica (ou seja, sendo mais vantajosa para uma das espécies), cujo efeito será ainda mais pronunciado quando os recursos são escassos (Jackson *et al.* 1998). Nos casos em que os nichos (ambiente onde esta espécie parasitária é capaz de alcançar maior fitness, proteger-se da imunocompetência do hospedeiro e garantir maior capacidade reprodutiva) de duas espécies parasitárias se sobrepõem, a espécie mais frágil, para sobreviver, é obrigada a optar por uma localização alternativa, subótima para a sua fitness. Se esta situação se mantiver no decurso de gerações, esse passará a ser o novo nicho da espécie. Para além da alteração de nichos, esta competição interespecífica comporta um impacto sobre o crescimento (Poulin *et al.* 2003-2), sobre a fecundidade (Holland 1984), até ao ponto de interferir com a própria sobrevivência da espécie parasitária no interior do hospedeiro (Poulin *et al.* 2003-2), culminando na sua extinção. A competição por recursos dá-se também entre indivíduos da mesma espécie, competição intra-específica, dependente da densidade. Assim, a competição entre machos pelo acesso à cópula com a fêmea traduz-se num forte investimento energético, seja no crescimento somático como do aparelho reprodutivo (Poulin e Morand 2000).

O conceito de “fitness” pode ser definido como o poder reprodutivo de um organismo, ou seja, a taxa de conversão de energia em descendência (Brown 1993), ou ainda, a contribuição média de um alelo ou genótipo para a geração seguinte ou para as sucessivas gerações, comparativamente à de outros alelos ou genótipos” (Futuyma 1986). A selecção natural conduziu a uma evolução genética dos organismos parasitantes com a finalidade de maximizarem a sua fitness, e quando a adição ou substituição de um hospedeiro possa culminar numa variação genética favorável a uma maior fitness, esta alteração será favorecida (Poulin 2007-1), podendo reduzir a sua especificidade para com a espécie no momento em que o hospedeiro alternativo, fisiológica e ecologicamente semelhante ao original, esteja disponível (Navarro *et al.* 2005). Deste modo, adaptações morfo-funcionais difundem-se e permanecem numa população graças à capacidade de garantir uma maior fitness (Poulin 2007).

Componentes importantes da fitness parasitária são: a complexidade do ciclo de vida, o grau de especialização para com um ou mais hospedeiros; um estadio infectante e parasitário mais ou menos evidente (Combes 1997). A dimensão é sem dúvida um parâmetro fundamental da fitness de um parasita, que influencia muito as características do seu ciclo de vida, em particular o seu potencial reprodutivo (Peters 1983, Stearns 1992). Vários são os factores que podem influenciar as dimensões de um parasita, como o estado imunitário do hospedeiro, a carga parasitária, sendo um dos mais importantes a dimensão do hospedeiro. Quanto maior o hospedeiro menor a limitação de espaço e maior fornecimento de nutrientes ao parasita

(Monrand & Sorci 1998). Contudo não poder ser formulada uma lei geral em como todas as populações parasitárias obtêm vantagem das grandes dimensões do hospedeiro (Monrad e Poulin 2002) e de um aumento da fecundidade (Poulin 1995).

As dimensões corporais do parasita e a fecundidade são dois dos principais parâmetros que podem ser utilizados para compreender as variações de fitness e a capacidade de adaptação de um parasita a um novo ambiente, pois os atributos que primeiramente tendem a modificar-se são ligados à reprodução, como uma resposta a uma pressão por um aumento do potencial reprodutivo (Stearns 1992; Hudson et al 2002; Poulin 2007). Por este motivo, neste estudo, são estas as medidas utilizadas para avaliar a fitness parasitária de um mesmo parasita em três hospedeiros diferentes, e desta forma perceber se este se está a adaptar a novos ambientes.

2.5. Materiais e métodos

Recolha de amostras

Neste estudo, foram analisados um total de 79 lagomorfos provenientes da Região de Piemonte (província de Alessandria e Cuneo) e Emilia Romagna (província de Bologna). Os animais foram abatidos em época de caça ou em área de abate para controlo numérico da espécie (caso de *S. floridanus*), entre os anos de 2009 a 2014, no período de Outono/Inverno. Após o abate, o pacote gastro-intestinal de cada animal foi recolhido e congelado a -20°C.

A selecção das amostras baseou-se na espécie hospedeira e na zona de proveniência (gráfico 1). Foram analisados animais de diferentes áreas, agrupados do seguinte modo: 1) animais provenientes de áreas de planície onde os três hospedeiros *L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus* vivem em simpatia; 2) animais provenientes de zonas de montanha Alpinas (habitat de *L. europaeus* e de *L. timidus*; onde *S. floridanus* não está presente) e 3) animais provenientes de uma zona de colina na província de Bologna, onde se encontra um núcleo de uma população de *S. floridanus* introduzido mais recentemente (há cerca de trinta anos) e que não tem contacto com a população alóctone que inicialmente foi introduzida em Itália.

Subdivisão do nº de amostras segundo espécie hospedeira e zona de proveniência

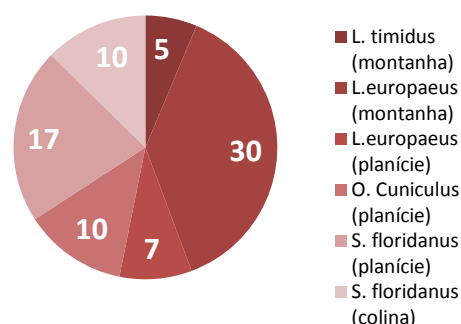


Gráfico 1. Subdivisão do número de amostras segundo a espécie hospedeira (*L. europaeus*, *L. timidus*, *S. floridanus*, *O. cuniculus*) e a área de proveniência (montanha, colina ou planície).

Análise laboratorial

Aquando da análise, após descongelamento, procedeu-se à separação de estômago, intestino delgado e intestino grosso (figura 7 a.). Após ruptura das serosas, seguiu-se à secção destas vísceras (estômago pela curvatura maior e intestino em toda a sua extensão) com o auxílio de um enterótomo. Cada uma foi colocada num *becker* individual (figura 7 b.), seguindo-se a lavagem do seu conteúdo com água e raspagem de mucosa com uma pinça. O material obtido foi deixado a sedimentar. Após eliminação do sobrenadante, o sedimento foi lavado e filtrado com o auxílio de um coador de malha fina, e colocado em placas de petri sobre um fundo negro para ser sujeito a observação e recolha parasitas (figura 7 c.). Todos os nemátodes encontrados foram conservados em tubos ependorf com álcool a 70%, enquanto que os céstodes foram mantidos em solução AFA (3% de ácido acético, 15% de formalina e 82% de álcool a 50%). No caso do intestino delgado, o conteúdo total foi diluído em 1litro de água e procedeu-se à observação de 100mL. Os restantes 90% foram analisados somente nos casos em que o número de parasitas encontrados fosse muito reduzido (cut-off definido como 15 machos e 15 fêmeas). Por último procedeu-se à identificação das espécies de parasitas com o auxílio do microscópio óptico e a chave de identificação sugerida por Skriabin *et al.* (1954).



Figura 7. Diferentes fases da análise laboratorial: a. Aparelho gastro-intestinal de leporídeo e materiais utilizados; b. amostra resultante da lavagem do conteúdo gastro-intestinal; c. Pesquisa de parasitas em placa de petri sobre um fundo negro (fotografias originais).

Análise morfológica

O nemátode *T. calcaratus* foi registado nas três espécies hospedeiras que habitavam em simpatia: *L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*. Por este motivo, foi tido como caso estudo para avaliar a sua adaptação morfo-funcional nas três espécies. Como referido anteriormente, dimensões corporais e fecundidade são dos principais parâmetros úteis na avaliação da fitness de um parasita a um ambiente. Por este motivo, as variações morfológicas foram avaliadas tendo em conta os seguintes parâmetros: comprimento do corpo, gubernáculo e espículas no caso do macho e contagem do número médio de ovos no caso da fêmea.

Neste trabalho, em vez de se recorrer à tradicional recolha de medidas através da escala micrométrica do microscópio óptico, optou-se por utilizar um método que permitisse um resultado mais rápido e preciso. Assim, as imagens obtidas no microscópio óptico foram captadas com uma câmara fotográfica e posteriormente feitas as medições utilizando o programa Quantum G.I.S. (tradicionalmente utilizado em sistemas de informação geográficos).

O aparelho reprodutivo do macho *T. calcaratus* (figura 8 à direita) é constituído pelo gubernáculo (figura 8 (1)) e por duas espículas assimétricas, uma em forma de arpão (figura 8 (2) e uma outra que termina em forma mais afilada, denominada seca (figura 8 (3)). O comprimento destas estruturas bem como do corpo do macho (figura 8 à esquerda) foram medidos através vectores, indicados a vermelho na figura 8. A contagem dos ovos nas fêmeas foi efectuada no microscópio óptico (figura 9). As medições foram efectuadas num total de 252 *T. calcaratus* isolados em *S. floridanus*, *L. europaeus* e *O. Cuniculus* de planície, num máximo de 15 machos e 15 fêmeas por hospedeiro.



Figura 8. Macho de *T. calcaratus* (à esquerda, ampliação 20x) e respectivo aparelho reprodutivo do macho (à direita, ampliação 160x): (1) gubernáculo, (2) espícula arpão, (3) espícula seca. As linhas a vermelho exemplificam o processo de medição do comprimento das estruturas através do programa QGIS (fotografias originais).



Figura 9. Fêmea de *T. calcaratus*. Ovo sinalizado por uma seta (ampliação 20x) (fotografia original).

2.6. Resultados

Os resultados obtidos nesta pesquisa foram organizados da seguinte forma:

- Descrição da comunidade parasitária gastro-intestinal nos lagomorfos
- Adaptação morfo-funcional (fitness) dos parasitas à espécie hospedeira:
caso estudo de *Trichostrongylus calcaratus*

2.6.1. Descrição da comunidade parasitária gastro-intestinal nos lagomorfos

A distribuição dos parasitas por hospedeiro e a riqueza parasitária que resultaram da análise laboratorial são indicadas na tabela 1.

Foram isolados seis nemátodes (*Obeliscoides cuniculi* ao nível do estômago e *Trichostrongylus retortaeformis*, *T. calcaratus*, *T. affinis*, *Passarulus ambiguus*, *P. nonanulatus* e

Trichuris leporis ao nível dos intestinos delgado e grosso), um tremátode (*Dicrocoelium dendriticum*) e um céstode que foi identificado como sendo da espécie *Anaplocephala wimerosa*, parasita característico do hospedeiro *L. timidus*. Foi ainda isolado um total de oito céstodes em *L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*, mas uma vez que não foi possível realizar as técnicas necessárias à sua identificação, estes não foram considerados.

	<i>L. timidus</i> (montanha)	<i>L. europaeus</i> (montanha)	<i>L. europaeus</i> (planície)	<i>O. cuniculus</i> (planície)	<i>S. floridanus</i> (planície)	<i>S. floridanus</i> (colina)
<i>Trichostrongylus retortaeformis</i>		X			X	
<i>Trichostrongylus calcaratus</i>			X	X	X	X
<i>Trichostrongylus affinis</i>					X	X
<i>Obeliscoides cuniculi</i>			X	X	X	X
<i>Passarulus ambiguus</i>		X				
<i>Passarulus nonanulatus</i>						X
<i>Trichuris leporis</i>		X				
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>		X				
<i>Anaplocephala wimerosa</i>	X					
Riqueza parasitária	1	4	2	2	4	4

Tabela 1. Espécies parasitárias encontradas, subdivididas por espécie hospedeira e zona de proveniência e sua respectiva riqueza parasitária (número de espécies encontradas).

S. floridanus partilha com o coelho e a lebre de planície os nemátodes *T. calcaratus* e *O. cuniculi*, enquanto *T. retortaeformis* foi encontrado em todas as lebres e em *S. floridanus* de planície. As espécies *P. ambiguus*, *Trichuris leporis* (figura 10, à esquerda) e *D. dendriticum* foram encontradas exclusivamente em lebres de montanha. *T. affinis* foi isolado em ambos os coelhos-da-florida e *P. nonanulatus* somente no núcleo de colina. A população de *L. timidus* apresentava como único parasita *Anaplocephaloida wimerosa* (figura 10, à direita). O parasita *Graphidium strigosum*, anteriormente descrito no coelho-bravo desta região (Rossi 1986), não foi isolado.

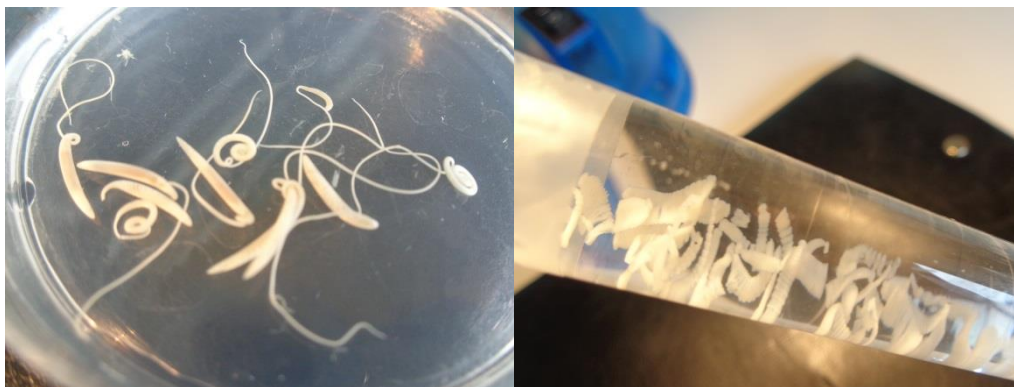


Figura 10. À esquerda os nemátodes *Trichuris leporis* e à direita os céstodes *Anaplocephala wimerosa* (fotografias originais).

As características da comunidade parasitária, ou seja, a prevalência (percentagem de indivíduos parasitados sobre o total de analisados), intensidade média (número médio de parasitas sobre o total de animais parasitados) e a abundância média (número médio de parasitas sobre o total de animais analisados) são demonstrados nas seguintes tabelas 2, 3 e 4).

Prevalência	<i>L. timidus</i> (montanha) N=5	<i>L. europaeus</i> (montanha) N=30	<i>L. europaeus</i> (planície) N=7	<i>O. cuniculus</i> (planície) N=10	<i>S. floridanus</i> (planície) N=17	<i>S. floridanus</i> (colina) N=10
<i>T. retortaeformis</i>	0	23,3	0	0	5,9	0
<i>T. calcaratus</i>	0	0	100	100	96,1	50
<i>T. affinis</i>	0	0	0		88,2	10
<i>O. cuniculi</i>	0	0	43	80	70,6	80
<i>P. ambiguus</i>	0	3,3	0	0	0	0
<i>P. nonanulatus</i>	0	0	0	0	0	70
<i>T. leporis</i>	0	50	0	0	0	0
<i>D. dendriticum</i>	0	3,3	0	0	0	0
<i>A. wimerosa</i>	60	0	0	0	0	0

Tabela 2. Prevalência (em percentagem) dos diversos parasitas subdivididos por espécie hospedeira e local de proveniência (num tom mais escuro estão representados os parasitas típicos de *S. floridanus*). N – número de animais analisados por espécie.

As espécies parasitárias que apresentam maior prevalência são *T. calcaratus*, seguida de *O. cuniculi* e *T. affinis*. As prevalências mais baixas verificam-se em *D. dendriticum*, seguido de *P. ambiguus* e *T. retortaeformis*.

Intensidade média	<i>L. timidus</i> (montanha) N = 5	<i>L. europaeus</i> (montanha) N = 30	<i>L. europaeus</i> (planície) N = 7	<i>O. cuniculus</i> (planície) N = 10	<i>S. floridanus</i> (planície) N= 17	<i>S. floridanus</i> (colina) N = 10
<i>T. retortaeformis</i>	0	53	0	0	1	0
<i>T. calcaratus</i>	0	0	48,6	221,4	73,4	98
<i>T. affinis</i>	0	0	0	0	84	0,16
<i>O. cuniculi</i>	0	0	26,7	62,1	18,7	10,1
<i>P. ambiguus</i>	0	260	0	0	0	0
<i>P. nonanulatus</i>	0	0	0	0	0	249,1
<i>T. leporis</i>	0	7,4	0	0	0	0
<i>D. dendriticum</i>	0	1	0	0	0	0
<i>A. wimerosa</i>	102,7	0	0	0	0	0

Tabela 3. Intensidade dos diversos parasitas subdivididos por espécie hospedeira e local de proveniência (num tom mais claro estão representados os parasitas típicos de *S. floridanus*). N – número de animais analisados por espécie.

As espécies que apresentam uma maior intensidade são *T. calcaratus*, *P. ambiguus* e *P. nonannulatus*. As espécies *D. dendriticum*, *Trichuris leporis* e *T. retortaeformis* apresentam as intensidades mais baixas.

Abundância média	<i>L. timidus</i> (montanha) N=5	<i>L. europaeus</i> (montanha) N=30	<i>L. europaeus</i> (planície) N=7	<i>O. cuniculus</i> (planície) N=10	<i>S. floridanus</i> (planície) N=17	<i>S. floridanus</i> (colina) N=10
<i>T. retortaeformis</i>	0	12,4	0	0	0,1	0
<i>T. calcaratus</i>	0	0	48,6	221,4	69,1	49
<i>T. affinis</i>	0	0	0	0	74,1	0,1
<i>O. cuniculi</i>	0	0	11,4	49,7	13,2	8,1
<i>P. ambiguus</i>	0	8,7	0	0	0	0
<i>P. nonannulatus</i>	0	0	0	0	0	174,4
<i>T. leporis</i>	0	3,7	0	0	0	0
<i>D. dendriticum</i>	0	0,03	0	0	0	0
<i>A. wimerosa</i>	61,6	0	0	0	0	0

Tabela 4. Abundância dos diversos parasitas subdivididos por espécie hospedeira e local de proveniência (num tom mais escuro estão representados os parasitas típicos de *S. floridanus*). N – número de animais analisados por espécie.

A abundância mais elevada verificou-se nas espécies *T. calcaratus*, *P. nonannulatus* e *O. cuniculi* e a mais baixa em *D. dendriticum*, *Trichuris leporis* e *T. retortaeformis*.

Relativamente aos parasitas encontrados em mais do que um hospedeiro, foi testada a presença de diferença significativa de prevalência e de intensidade média ligadas à espécie hospedeira através do teste de Kruskal-Wallis e Qui-quadrado, respectivamente (significância para $p < 0,05$). Exceptuando *T. retortaeformis* (K-Wallis: $p = 0,1089$ e Q^2 : $p = 0,09986$), verificou-se uma diferença significativa de prevalência e intensidade média ligadas ao hospedeiro: *T. calcaratus* (K-Wallis: $p = 8,657 \times 10^{-06}$ e Q^2 : $p = 6,634 \times 10^{-06}$); *O. cuniculi* (K-Wallis: $p = 1,75 \times 10^{-08}$ e Q^2 : $p = 1,686 \times 10^{-7}$).

Nos gráficos seguintes, vêm comparadas as cargas parasitárias dos dois parasitas alóctones (*T. calcaratus* e *O. cuniculi*) encontradas nos diferentes hospedeiros.

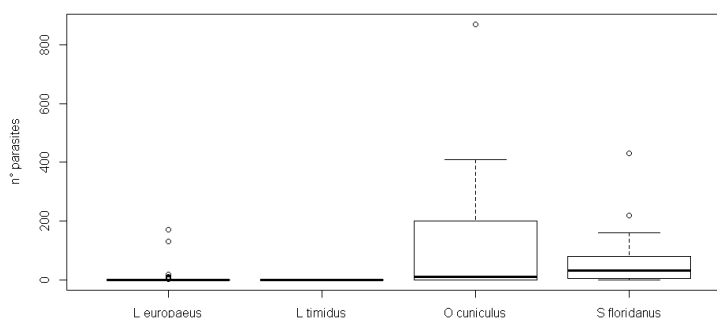


Gráfico 2. Carga parasitária de *T. calcaratus* segundo a espécie hospedeira.

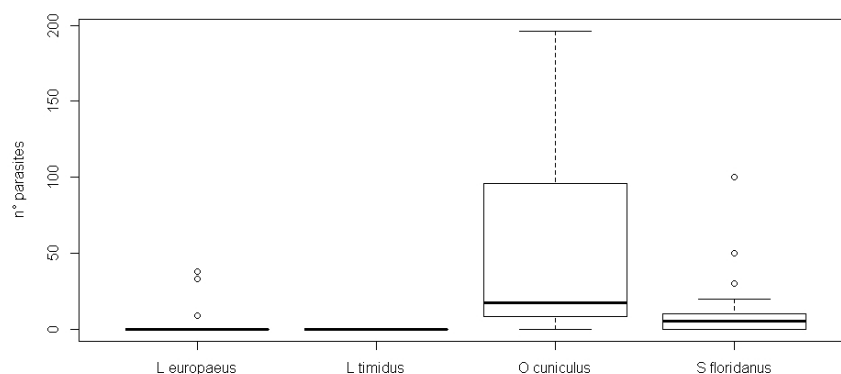


Gráfico 3. Carga parasitária de *O. cuniculi* segundo a espécie hospedeira.

Ambos os nemátodes apresentam uma carga parasitária consideravelmente superior no coelho-bravo.

2.6.2 Adaptação morfo-funcional de *T. calcaratus* ao hospedeiro

Como já referido, a análise morfológica de *T. calcaratus* foi conduzida através da medição do comprimento do corpo do macho, do comprimento das estruturas do aparelho reprodutivo masculino (gubernáculo e espículas) e contagem do número de ovos no interior do útero das fêmeas.

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro resultando uma distribuição dos dados não normal. A análise detalhada do modelo estatístico utilizado encontra-se no anexo II.

No que respeita ao comprimento do corpo, verificou-se que os machos de *T. calcaratus* em *S. floridanus* apresentaram um valor maior de mediana, seguindo-se os machos presentes em *O. cuniculus* e *L. europaeus* (tabela 2).

Corpo do macho	Média	SD	Mediana	max	min	range	cv
<i>L. europaeus</i>	4601.5	444.1	4633.3	5206.3	3238.2	1968.1	10
<i>O. cuniculus</i>	4719.8	300.5	4727.9	5680.1	4080.4	1599.7	10
<i>S. floridanus</i>	4611.5	766.0	4769.4	6851.4	2947.7	3903.8	20

Tabela 2. Análise descritiva do comprimento do corpo do macho em função da espécie hospedeira (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*): média, desvio padrão (SD), mediana, comprimento máximo (max), comprimento mínimo (min) e range em micrómetros e coeficiente de variação (cv) em percentagem.

Quanto às estruturas do aparelho reprodutivo masculino (gubernáculo e espículas arpão e seca) foi no hospedeiro *L. europaeus* que apresentaram um comprimento superior, seguindo-se em *O. cuniculus* e *S. floridanus* (tabelas 3, 4, 5 e gráfico 2).

Gubernáculo	Média	SD	Mediana	max	min	range	cv
<i>L. europaeus</i>	100.64	5.36	100.64	109.87	93.92	15.95	5.3
<i>O. cuniculus</i>	98.26	8.41	96.77	119.66	73.42	46.24	8.6
<i>S. floridanus</i>	92.17	10.56	92.30	131.19	65.67	65.52	11.5

Tabela 3. Análise descritiva do comprimento do gubernáculo em função da espécie hospedeira (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*): média, desvio padrão (SD), mediana, comprimento máximo (max), comprimento mínimo (min) e range em micrómetros e coeficiente de variação (cv) em percentagem.

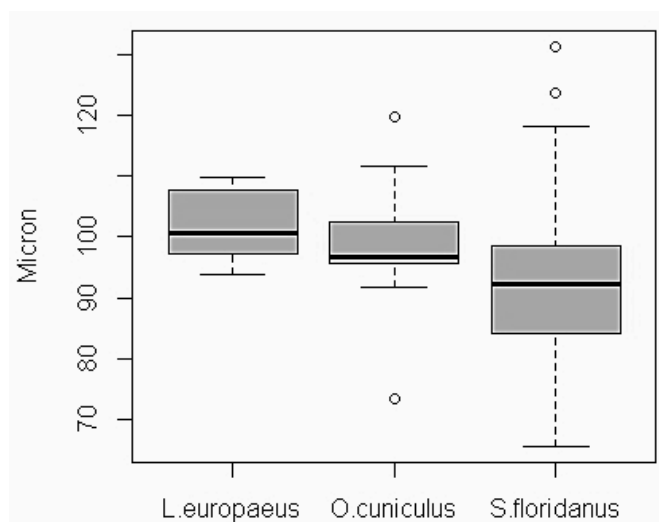


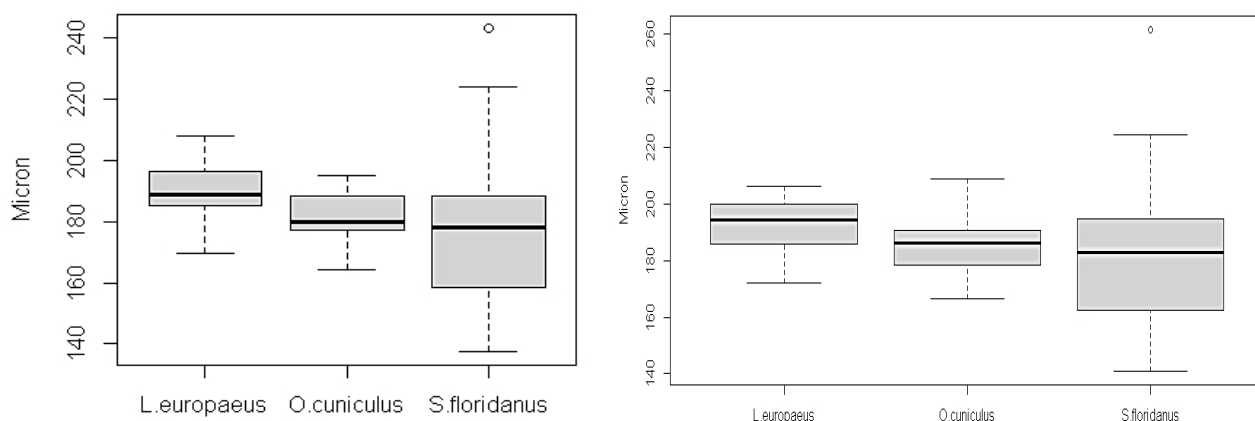
Gráfico 4: Variação do comprimento do gubernáculo de acordo com o hospedeiro (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*) em micrómetros.

Espícula arpão	Média	SD	Mediana	max	min	range	cv
<i>L. europaeus</i>	189.78	9.58	188.77	207.84	169.78	38.06	5
<i>O. cuniculus</i>	180.80	8.19	179.72	195.05	164.11	30.93	4.5
<i>S. floridanus</i>	175.01	18.84	177.99	243.22	137.49	105.74	10.8

Tabela 4. Variação do comprimento da espícula arpão em função da espécie hospedeira (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*): média, desvio padrão (SD), mediana, comprimento máximo (max), comprimento mínimo (min) e range em micrómetros e coeficiente de variação (cv) em micrómetros.

Espícula seca	Média	SD	Mediana	max	min	range	cv
<i>L. europaeus</i>	193.26	9.12	194.57	206.23	172.01	34.22	4,7
<i>O. cuniculus</i>	186.47	10.70	186.21	208.74	166.47	42.27	5,7
<i>S. floridanus</i>	180.24	19.96	183.00	261.60	141.03	120.56	11,1

Tabela 5. Variação do comprimento da espícula seca em função da espécie hospedeira (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*): média, desvio padrão (SD), mediana, comprimento máximo (max), comprimento mínimo (min) e range em micrómetros e coeficiente de variação (cv) em micrómetros.



Gráficos 5 e 6. Variação das espículas arpão (à esquerda) e seca (à direita) em função do hospedeiro (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*) (micrômetros).

As fêmeas presentes no hospedeiro *S. floridanus* foram as que apresentaram um maior número de ovos, seguindo-se *O. cuniculus* e *L. europaeus*, com valores próximos entre si (tabela 6 e gráfico 7)

Nº de ovos	Média	SD	Mediana	max	min	range	cv
<i>L. europaeus</i>	17.3	6.1	18	32	3	29	40
<i>O. cuniculus</i>	17.7	5.5	18	31	5	26	30
<i>S. floridanus</i>	31.3	13.1	29	70	0	70	40

Tabela 6. Variação do número de ovos por fêmea em função da espécie hospedeira (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*): média, desvio padrão (SD), mediana, comprimento máximo (max), comprimento mínimo (min) e range em micrômetros e coeficiente de variação (cv).

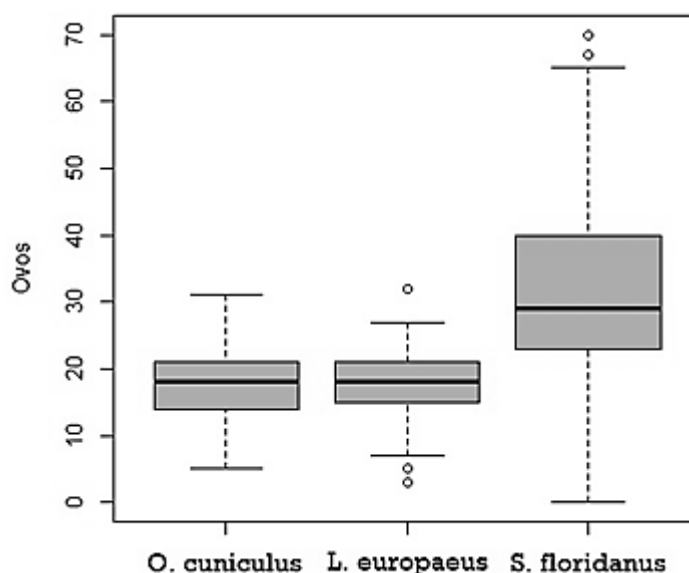


Gráfico 7. Variação do número de ovos de acordo com o hospedeiro (*L. europaeus*, *O. cuniculus* e *S. floridanus*).

Com o objectivo de avaliar a influência dos factores “carga parasitária” e “espécie hospedeira”, foi utilizada estatística multivariada, e medida a influência combinada dos factores sobre uma variável dependente, neste caso os comprimentos no macho e o número de ovos na

fêmea. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. Perante os valores de AIC obtidos, o modelo explicativo mais adequado, o qual foi utilizado, foi o glm (generalized linear model).

O resultado da análise estatística apresentou uma influência significativa do factor carga parasitária na variação do comprimento do corpo ($p = 3,8e-08$) (anexo II Tabela A1). Nenhuma correlação significativa entre o factor hospedeiro e o comprimento do corpo do macho foi registada (valores de p de 0,0568 e 0,4361). Segundo os parâmetros de dispersão Gamma (anexo II), o factor carga explica 11,7% das variações de comprimento do corpo do macho.

Em todas as estruturas do aparelho reprodutivo, foram registados valores de p significativos para os factores carga parasitária e hospedeiro.

No gubernáculo, $p=9,34 \times 10^{-07}$ para o factor carga e para o factor hospedeiro $p=0,000137$ (anexo II Tabela A2); na espícula arpão, $p = 1,39 \times 10^{-08}$ e $p = 0,00149$ respectivamente (Anexo II tabela A3) e na espícula seca, $p = 7,07 \times 10^{-11}$ e $p = 0,0124$ para os mesmos factores respectivamente (anexo II tabela A4).

Segundo os parâmetros de dispersão Gamma (anexo II), os factores carga e hospedeiro explicam 17,1% das variações de comprimento do gubernáculo, 17,3% das variações de comprimento da espícula arpão e 19,3% na espícula seca.

Nas fêmeas, os valores de p foram significativos para os factores carga parasitária e hospedeiro ($p=0,00284$ para o factor carga e $p<2 \times 10^{-16}$) (anexo II tabela A5). Estes dois factores explicam 37,5% da variação do número de ovos entre fêmeas provenientes de hospedeiros diferentes.

2.7. Discussão

2.7.1. A comunidade parasitária

O primeiro objectivo deste trabalho é caracterizar a comunidade parasitária dos lagomorfos da região, quer em áreas de simpatia com a espécie alóctone *S. floridanus* (zona de planície) quer em áreas onde este contacto não se verifica.

Nos núcleos de montanha, *L. europaeus* e *L. timidus* apresentavam parasitas tipicamente descritos para a sua espécie como sendo os nemátodes *T. retortaeformis*, *P. ambiguus* e *Trichuris leporis* no caso da lebre-europeia (Poglayen 1994; Bordes 2007; Chroust 2012, Lukesová 2012) e o céstode *A. wimerosa* no caso da lebre-alpina (Meneguz & Rossi 1989). Comparativamente aos estudos mais recentes, realizados na mesma época do ano noutros países da Europa central, as prevalências e intensidades dos parasitas em *L. europaeus* de montanha encontram-se dentro do mesmo intervalo de valores (Poglayen 1994; Bordes 2007;

Dubinsky 2010; Chroust 2012, Lukesová 2012), excepto a elevada intensidade de *P. ambiguus*, um achado ocasional num único indivíduo analisado. O tremátode *D. dendriticum*, também encontrado em *L. europaeus* de montanha, é ocasionalmente isolado em lebres em zonas onde o pasto é partilhado por ovinos (Soveri 1983). Daqui se conclui que em condições de isolamento com a espécie *S. floridanus* é a comunidade parasitária autóctone que prevalece.

No grupo de hospedeiros *S. floridanus* pertencentes ao núcleo de colina, zona isolada da população introduzida originalmente em Itália, a fauna parasitária encontrada pertence à descrita na literatura no seu habitat de origem (Jacobson 1978; Andrews & Davidson 1980) ainda que nem todas as espécies estivessem presentes. A ausência de algumas espécies parasitárias descritas na área de origem pode ser explicada pelo “efeito fundador”, ou seja, a comunidade que foi importada não continha todas as espécies parasitárias, tal como noutros exemplos em literatura (Molnár 2009).

Na zona de planície (zona de convivência entre as espécies autóctones e a alóctone), a população parasitária encontrada nas espécies *L. europaeus* e *O. cuniculus* consistiu em dois nemátodes, *O. cuniculi* e *T. calcaratus*, ambos pertencentes à parasitofauna original de *S. floridanus* (Jacobson 1978; Andrews & Davidson 1980), e portanto alóctones para estes hospedeiros. Este constituiu o segundo isolamento de *Obeliscoides cuniculi* em *L. europaeus* (após Tizzani 2011) e o primeiro isolamento em *O. cuniculus* em liberdade.

Observação interessante é o facto das cargas parasitárias presentes no coelho-bravo (intensidade média de *T. calcaratus* de 221,4 nemátodes por animal parasitado e de *O. cuniculi* de 62,1) serem consideravelmente superiores às dos restantes hospedeiros (ver gráficos 2 e 3) incluindo a espécie nativa *S. floridanus*. Várias hipóteses podem ser avançadas para explicar este fenómeno. A razão desta carga tão elevada em *O. cuniculus* pode ser consequência da ecologia desta espécie. O coelho-bravo é um animal que vive em colónias (Nowak 1999), logo a taxa de transmissão entre indivíduos será maior, e, dos três hospedeiros comparados, é o único que habita em tocas, local onde os parasitas podem sobreviver por mais tempo. Pode por outro lado significar que, apesar do coelho-bravo não ser a espécie hospedeira nativa destes nemátodes, proporcionou um ambiente favorável ao crescimento destes parasitas, indicando que estes adquiriram um elevado grau de adaptação ao novo hospedeiro, ao ponto de se reproduzirem e atingirem tal intensidade de infestação. Por outro lado não se pode excluir a possibilidade de uma falta de imunidade por parte do *O. cuniculus* em relação ao “novo” parasita, o que lhe permite alcançar uma maior carga parasitária.

É de notar também que nos coelhos e nas lebres de planície analisados, a sua parasitofauna tradicional (*G. strigosum* a nível gástrico e *T. retortaeformis* e *Trichuris leporis* a nível intestinal, anteriormente descritos (Rossi 1986)), não estava presente em nenhum dos indivíduos. Estes resultados levam a considerar a hipótese de uma extinção da parasitofauna

autóctone e uma substituição da mesma pelas espécies parasitárias introduzidas com o lagomorfo alóctone.

Um dos *S. floridanus* analisados apresentava um exemplar do nemátode *T. retortaeformis*. Este acontecimento pode ser um achado ocasional desta espécie neste hospedeiro. Porém, segundo um estudo efectuado na mesma área (Gontero 2013) com um maior número de exemplares abatidos durante todo o ano, foram descritos mais isolamentos de *T. retortaeformis*. Estes isolamentos podem representar uma infestação do hospedeiro exótico *S. floridanus* pela espécie parasitária nativa *T. retortaeformis*. Segundo Torchin (2003), as espécies hospedeiras introduzidas adquirem parasitas do novo habitat onde se encontram, porém numa proporção muito menor ao número de parasitas que são capazes de evitar. A prevalência das espécies parasitárias autóctones nas populações de animais introduzidas é menos de metade do que nas nativas, não constituindo geralmente uma causa de perigo para a espécie invasora.

2.7.2. Adaptação morfo-funcional de *T. calcaratus*

O segundo objectivo deste trabalho era avaliar a adaptação morfo-funcional da espécie *Trichostrongylus calcaratus* ao hospedeiro, uma vez que este nemátode é partilhado pelos três lagomorfos que habitam em simpatia. Tal com já referido, são numerosas as variáveis que influenciam a fitness parasitária (Poulin 2007), e num estudo de campo como este, cujas amostras provêm de um ambiente não controlado, são inúmeras as pressões exercidas. Neste estudo observacional, pretendeu-se indagar acerca da influência da carga parasitária e da espécie hospedeira sobre a adaptação parasitária num hospedeiro.

Foram consideradas para isso as dimensões do corpo e das estruturas do aparelho reprodutivo no macho e o número de ovos produzido na fêmea, uma vez que são as características que melhor se relacionam com o “bem-estar” da população e com o seu potencial reprodutivo (Peters 1983; Stearns 1992). Com um aumento da densidade parasitária observa-se uma redução do “bem-estar” parasitário, o que leva a uma diminuição das dimensões corporais e uma diminuição da produção do número de ovos como consequência (Poulin 1999).

Uma vez que a distribuição dos resultados obtidos é não normal, foram comparados os valores das medianas. O comprimento do corpo do macho de *T. calcaratus* apresentou uma variação menor entre espécies, sendo os machos isolados de *S. floridanus* os mais longos, seguindo-se os de *O. cuniculus* e os de *L. europaeus*. A análise estatística apresentou uma influência significativa do factor carga parasitária para a variação do comprimento do corpo do macho de *T. calcaratus*. Dos três hospedeiros considerados, a lebre foi a que apresentou uma

menor carga parasitária de *T. calcaratus*, facto que levaria a esperar um maior comprimento do corpo do macho; enquanto que no caso do coelho, uma vez que a carga parasitária registada foi consideravelmente mais elevada, se esperaria um tamanho corporal inferior. Em vez disso os comprimentos foram todos próximos entre si, sendo inclusivamente até maiores nos parasitas isolados do coelho quando comparados aos isolados da lebre. De facto, e tal como o modelo estatístico levou a concluir, só 11,7% das variações do comprimento do corpo podem ser explicadas pela carga parasitária, devendo-se estas diferenças a outros factores. Porém o factor hospedeiro não influencia a variação do comprimento do corpo do macho.

No caso dos comprimentos do gubernáculo e espículas, estes foram os que apresentaram maior variação interespecífica, sendo os valores da mediana superiores na *L. europaeus* seguindo-se em *O. cuniculus* e por fim *S. floridanus*. A análise estatística apresentou uma influência significativa não só do factor carga parasitária mas também do factor espécie hospedeira na variação destas três dimensões, sendo capazes de explicar entre 17 a 19% das diferenças de comprimento. Assim, e apesar da percentagem explicativa não ser muito alta, o facto das estruturas reprodutivas se terem desenvolvido mais na lebre e no coelho mostra que os parasitas apresentam algum grau de adaptação morfo-funcional a estes novos hospedeiros.

Em relação à produção de ovos nas fêmeas, o valor de mediana foi consideravelmente superior na espécie *S. floridanus*. A análise estatística revelou que a carga parasitária e o hospedeiro influenciam significativamente o número de ovos produzido pelas fêmeas e que estes dois factores são responsáveis por 37,5% das variações. Verificou-se portanto que o efeito do hospedeiro actuou de um modo diferente no macho e na fêmea. Sendo que a produção de ovos por parte da fêmea é mais importante para o sucesso reprodutivo de um parasita, esta diferença na fertilidade parece indicar que *T. calcaratus* possui ainda uma capacidade de infestação superior no hospedeiro nativo.

Ficou também claro, que a carga parasitária e a espécie hospedeira são dois factores que contribuem em apenas uma pequena percentagem da adaptação parasitária, estando muitos outros factores envolvidos no sucesso do estabelecimento de um parasita num novo habitat, como por exemplo as condições ambientais, que influenciam a sobrevivência das formas infestastes.

Mesmo sendo capaz de se estabelecer no novo ambiente que é o interior das novas espécies coelho-bravo e lebre-comum, a espécie *T. calcaratus* ainda parece encontrar-se melhor adaptada ao seu hospedeiro original. Desta análise levanta-se a questão: será que esta adaptação de *T. calcaratus* aos novos hospedeiros é suficiente para que na ausência do seu hospedeiro original, o coelho-da-Florida, este parasita se desenvolva e se reproduza de modo a ser capaz de substituir totalmente o lugar antes ocupado por outras espécies parasitárias?

2.8 Conclusão

Quando uma espécie alóctone é introduzida num novo habitat nem sempre a ameaça biológica que representa é evidente. Com este trabalho comprova-se que não se trata da introdução de uma só espécie mas sim de toda uma comunidade parasitária alóctone, que se está a estabelecer nos lagomorfos e a substituir a comunidade parasitária autóctone. Os parasitas alóctones encontram novos nichos em hospedeiros com os quais não evoluíram em simultâneo, e que não estão, por isso, de igual forma adaptados às suas exigências. Este facto pode conduzir a uma competição entre animais mediada pela comunidade parasitária, provocando alterações a nível demográfico nas populações.

Novos estudos neste sentido seriam importantes, por exemplo recorrendo a um maior número de amostras, efectuando infestações experimentais em ambientes controlados (recintos ou gaiolas) o que permitiria avaliar a resposta imunitária do hospedeiro e perceber qual o efeito destes parasitas na sua fitness.

As consequências das invasões biológicas permitem o estudo de processos evolutivos básicos, uma vez que os invasores se desenvolvem rapidamente como resposta a novas condições bióticas e abióticas, e as espécies nativas evoluem em resposta a esta invasão (Parker *et al.* 2001). Estudos sobre a diversidade genética e as alterações evolutivas seriam interessantes para perceber o potencial colonizador, os padrões geográficos de invasão e o alcance de expansão destas novas espécies.

3. Outras actividades realizadas

Durante este estágio, paralelamente à pesquisa mais aprofundada sobre a fauna parasitária da comunidade de lagomorfos, foram ainda realizadas outras actividades, brevemente referidas nas próximas linhas.

- Colaboração com o Comprensorio Alpino CN2, onde as tarefas consistiam na identificação, registo de medidas biométricas e recolha de amostras das espécies pertencentes à fauna alpina cinegética, nomeadamente *Rupicapra rupicapra* (anexo I figura A1), *Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Sus scrofa* (anexo I figura A2), *Tetrao tetrix* e *Alectoris graeca*.

- Dois recenseamentos nocturnos com foco das espécies *L. europaeus*, *S. floridanus* e *C. capreolus*, que tiveram lugar numa zona de repovoação e captura na província de Alessandria.

- Dois recenseamentos diurnos das espécies *Capra ibex ibex* e *Rupicapra rupicapra*, que tiveram lugar no concelho de Bellino.

- Um recenseamento de *Alectoris rufa*, que decorreu na província de Alessandria, e que foi realizado recorrendo ao registo do canto espontâneo e do canto estimulado por chamamento.

- Necrópsia de um *Canis lupus*. O animal apresentava lesões dérmicas compatíveis com sarna sarcóptica. A suspeita de causa de morte foi envenenamento (anexo I figura A3).

- Colaboração como Assistente de campo num projecto de doutoramento sobre o flavivírus em avifauna selvagem, onde foi possível treinar técnicas de maneo e recolha de amostras de sangue em aves de diversas espécies, maioritariamente passeriformes, capturados nas províncias de Alessandria e Asti (figura 11 e anexo I figura A4).

- Autora em dois artigos submetidos para publicação na revista da Sociedade Italiana de Parasitologia (SOIPA - Società Italiana di Parassitologia), intituladas “Description of the helminth parasitofauna in an isolated population of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Alessandria, Italy” e “Coccidian oocysts as stress indicators in restocked *Lepus europaeus* from Western Europe.” (anexos III e IV).



Figura 11. Recolha de amostra de sangue num pica-pau malhado grande (*Dendrocopos major*) e anilhamento de um chapim azul (*Parus caeruleus*) (fotografias originais).

4. Conclusão final

Este estágio foi importante na medida em que permitiu o contacto e a aquisição de conhecimentos sobre um ambiente tão rico como é a fauna alpina e conhecer que estratégias são levadas a cabo no sentido de preservar o mais possível a biodiversidade que o caracteriza.

5. Bibliografia

Albon S.D. *et al.* (2002) "The role of parasites in the dynamics of a reindeer population." **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, 269(1500), 1625-1632

Amori G. *et al.* (2009) "Mammalia II: Erinaceomorpha, Soricomorpha, Lagomorpha, Rodentia." **Fauna d'Italia** Vol II Edagricole, Bologna 1000pp.

Andrews C.L. & Davidson W.R. (1980) "Endoparasites of selected populations of cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) in the Southeastern United States." **Journal of Wildlife Disease** 16: 395-401

Bertolino S. *et al.* (2011) "Daytime habitat selection by introduced eastern cottontail *Sylvilagus floridanus* and native European hare *Lepus europaeus* in Northern Italy." **Zoological science**, 28(6), 414-419

Boag B. (1985) "The incidence of helminth parasites from the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* (L.) in eastern Scotland." **Journal of helminthology** 59(01), 61-69.

Bordes F. *et al.* (2007) "Helminth communities of an introduced hare (*Lepus granatensis*) and a native hare (*Lepus europaeus*) in southern France." **Journal of wildlife diseases** 43(4), 747-751

Brown J.H. *et al.* (1993) "Evolution of body size: consequences of an energetic definition of fitness." **American Naturalist**, 573-58

Catalano S. (2009) "Adattamenti morfo-funzionali nella parassitofauna gastrointestinale della comunità di lagomorfi in Piemonte" **Tesi di laurea Sperimentale in Malattie Infettive delle Specie Esotiche**, Università degli Studi di Napoli

Chapman J.A. *et al.* (1980) "*Sylvilagus floridanus*" **Mammalian Species** 136: 1-8

Chroust K. *et al.* (1997) "Parasite load of European brown hares in Austria and the Czech Republic" **Veterinarni Medicina** 57, 2012 (10): 551–558 Original Paper

Combes C. (1997) "Fitness of parasites: pathology and selection." **International Journal for Parasitology**, 27(1), 1-10.

Dubinský P. *et al.* (2010). "Parasitic infections of the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) in south-western Slovakia." **Helminthologia**, 47(4), 219-225

Eira C. *et al.* (2007) "The helminth parasites of the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* and their effect on host condition in Dunas de Mira, Portugal." **Journal of helminthology**, 81(03), 239-246

Foronda P. *et al.* (2003) "Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Macaronesia." **Journal of Parasitology**, 89(5), 952-957

Futuyma J.D. (1987) **The American Naturalist** Vol. 130, N. 3, 465-473

- "Norme per le protezione della fauna selvatica omeoterma e per il prelievo venatorio." Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana – Legge 11 febbraio 1992, n°. 157
- Gibb, J. A. (1990) "The European rabbit *Oryctolagus cuniculus*." JA Chapman e JEC Flux (a cura di), Rabbits, Hares and Pikas-Staus Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group, 116-120
- Gontero C. (2013) "Studio sulla ecologia della parassitofauna di un vertebrato alloctono: il caso del silvilago in Piemonte" **Tesi di laurea in Produzioni animali**, Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Torino
- Holland C. (1984) "Interactions between *Moniliformis* (Acanthocephala) and *Nippostrongylus* (Nematoda) in the small intestine of laboratory rats." **Parasitology** 88(02), 303-315.
- Hudson P.J. et al (2002) "Trophic interactions and population growth rates: describing patterns and identifying mechanisms." **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 37: 1259-1272
- Irvin A.D. (1970) "Gastrointestinal parasites of British hares (*Lepus europaeus* and *Lepus timidus*)" **Journal of Zoology** 162, 544–546
- IUCN 2000 "Guidelines for the prevention of biodiversity loss due to biological invasion." **IUCN – The World Conservation Union**, Gland, Switzerland
- Jackson J.A. et al. (1998) "Mutual exclusion of congeneric monogean species in a space-limited habitat." **Parasitology** 117: 563-569
- Jacobson H.A. (1978) "Disease and physiologic characteristics of two cottontail populations in Virginia." **Wildlife Monographs** 3-53
- Kuderling et al. (1979) "Investigations on seasonal rhythms and the effect of melatonin in the alpine hare (*Lepus timidus timidus* L.) In **The Pineal Gland of Vertebrates Including Man. Progress Brain Research**. Elsevier, North-Holland Biomedical Press 52: 417-420.
- Lafranchi P. (1995) "Elmintofauna e Gestione Sanitaria del Patrimonio Faunistico nell'Arco Alpino" **XIII Convegno APIV**
- Lind E.A. (1961) "On the occurrence, daily activity, and Spring moult of the snow hare (*Lepus timidus*) at Kilpisjärvi in Enotekio. **Suomen Riista** 14: 106-111
- Lukešová D. et al. (2012) "Endoparasites in European hares (*Lepus europaeus*) under gamekeeping conditions in the Czech Republic." **Helminthologia** 49(3), 159-163.
- Macdonald D.W. & Barrett P. (1993) "Mammals of Europe." **New Jersey: Princeton University Press**
- Mack R.N. et al. (2000) "Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control." **Ecological Applications**, 10: 689-710
- Marcogliese D.J. & Cone D.K. (1997) "Food webs: a plea for parasites." **Trends in Ecology and Evolution** 12: 320-325

- Meneguz P.G. & Rossi L. (1988) "Indagine parassitologica sulla fauna minore di montagna oggetto di prelievo venatorio: risultati preliminar" **Suppl. Ric. Biol. Selv.** 639-640
- Meneguz P.G. (1989) "Le parassitosi gastro-intestinali della Lepre variabile" **Caccia Alpina** Suppl. N.2: 34-35
- Meneguz, P.G. & Rossi L. (1990) "Parasites of the digestive tract in the varying hare (*Lepus timidus*) in the Italian Alps." **Parassitologia** 32 (Supplemento), 182-183.
- Meriggi, A., & Alieri, R. (1989). Factors affecting brown hare density in northern Italy. *Ethology Ecology & Evolution*, 1(3), 255-264
- Molina X. *et al.* (1999) "Influence of host weight, sex and reproductive status on helminth parasites of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in Navarra, Spain." **Journal of helminthology** 73(03), 221-225
- Molnár K. (2009) "Data on the parasite fauna of the European common carp *Cyprinus carpio carpio* and Asian common carp *Cyprinus carpio haematopterus* support an Asian ancestry of the species." **AACL Bioflux**, 2: 391-400
- Morand S. & Sorci G. (1998) "Determinants of life-history evolution in nemátodes." **Parasitology Today**, 14: 193-196
- Morand S, & Poulin R. (2002) "Body size-density relationships and species diversity in parasitic nematodes: patterns and likely processes." **Evolutionary Ecology Research** 4: 951-961
- Mussa P.P. (1991) "Indagine sulla Diffusione e sui Problemi Derivanti dalla Presenza dell' *Sylvilagus floridanus* in Provincia di Torino, Assessorato Caccia e Pesca, F.I.d.C. -S.I.P.S.
- Mussa P.P. (1996) "Il silvilago in provincia di Torino." **Habitat**, 61, 5-11.
- Navarro P. *et al.* (2005) "The component helminth community in six sympatric species of Ardeidae." **Journal of Parasitology** 91: 775-779
- Nowak R.M. (1999) **Walker's Mammals of the World** 6, JHU Press
- Parker, M., Thompson, J. N., & Weller, S. G. (2001) "The population biology of invasive species." **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 32, 305-32
- Paterson A.M. & Banks J. (2001) "Analytical approaches to measuring cospeciation of host and parasites: through a glass, darkly." **International Journal of Parasitology** 31: 1012-1022
- Pérez S.S. *et al.* (2008) "Density and habitat use by the european wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in a agricultural area of northern Italy" **Hystrix It. J. Mamm.** 19 (2) (2008): 63-76
- Peters R.H. (1983) "The Ecological Implications of Body Size." **Cambridge University Press**, Cambridge. 329 pp.
- Price P.W. *et al.* (1988) "Parasite-mediated competition: some predictions and tests." **American Naturalist**, 544-555

Poglayen, G. *et al.* (1994) "Parassiti dell'appareto digerente della lepre (*Lepus europaeus*) nelle province di Bologna e Bolzano." **Selezione Veterinaria** 35, 193-199.

Poulin R. (1995) "Evolution of parasite life history traits: myths and reality." **Parasitology Today** 109: S109-S118

Poulin R. & Morand S. (2000) "Testes size, body size and male–male competition in acanthocephalan parasites." **Journal of Zoology**, 250(4), 551-558.

Poulin *et al* (2003) "Effects of conspecifics and heterospecifics on individual worm mass in four helminth species parasitic in fish." **Parassitology Research** 90:143-147

Poulin R. (2007)-1 **Evolutionary Ecology of Parasites** 2nd edition Princeton University Press Princeton 342pp.

Poulin R. (2007)-2 "Are there general laws in parasite ecology?" **Parassitology** 134: 763-776

Rosin *et al.* (2008) "Introduced lagomorphs as a threat to "native" lagomorphs: The case of the Eastern cottontail (*Sylvilagus floridanus*) in northern Italy." **Lagomorph Biology**, 153-164 Springer Berlin Heidelberg

Rossi *et al.* (1986) in **Annali Istituto Superiore di Sanità**, 22 (1): 341-344

Silvano F. *et al.* (2000) "Distribution of the eastern cottontail *Sylvilagus floridanus* in the province of Alessandria." **Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy**, 11(2), 75-78

Skrjabin K.I. *et al.* (1954) **Essential of Nematodology**, Volume III: Trichostrongylids of Animals and Man (ed. Skrjabin KI). The Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Smith R.K. *et al.* (2005) "A quantitative analysis of the abundance and demography of European hares *Lepus europaeus* in relation to habitat type, intensity of agriculture and climate." **Mammal review** 35 (1), 1-24

Statuto del Comitato - Comprensorio Alpino C.A. CN2 "Valle Varaita" (1998)

Stearns S.C. (1992) **The evolution of life histories** Vol. 248 Oxford University Press

Stenseth N.C & Maynard-Smith J. (1984) "Coevolution un ecosystems-red queen evolution or stasis." **Evolution** 38: 870-880

Soveri T *et al.* (1983) "Endoparasites of hares (*Lepus timidus* L. and *L. europaeus* Pallas) in Finland." **Journal of Wildlife Diseases** 19: 337-341

Soveri T. *et al.* (1992) "Blood chemistry and endoparasites of the Mountain hare (*Lepus timidus*) in high and low density populations" **Journal of wildlife Diseases** 28: 242-249

Stearns S.C. (1992) **The evolution of life histories** Vol. 248 Oxford University Press.

Thomson J.N. (1994) "The Coevolutionary Process" **University of Chicago Press**, Chicago

Tizzani P. (2000) "*I nematodi gastrointestinali di Sylvilagus floridanus*" Tesi di laurea Università di Torino

Tizzani P. (2007) "Lepre variabile" **Manuale per il cacciatore di Montagna** Edizione Provincia di Belluno

Tizzani P. *et al.* (2011) "First report of *Obeliscoides cuniculi* in European brown hare (*Lepus europaeus*)."
Parasitology research, 109(3), 963-966

Torchin M.E. *et al.* (2003) "Introduced species and their missing parasites." **Nature** 421: 628-630

Tosi G. (1998) "Lepre alpina" In **Principi Tecniche di Gestione Faunistico Venatoria** Greentime Bologna

Trocchi V. & Riga F. (2005) "I Lagomorphy in Italia. Linee Guida per la Conservazione e la Gestione." **Min. Politiche Agricole e Forestali, Ist. NAz. Fauna Selvatica, Documenti Tecnici** 25: 1-128

6. Anexos

Anexo I

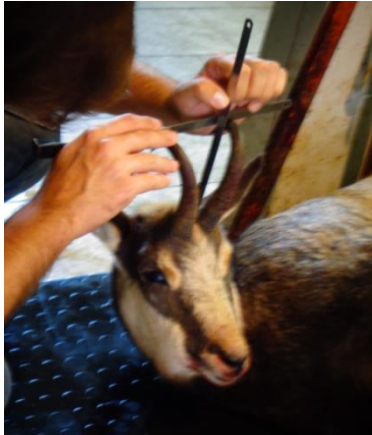


Figura A1. Registo da altura das astes na espécie *Rupicapra rupicapra*.



Figura A2. Recolha de uma amostra de sangue na espécie *Sus scrofa*.



Figura A3. Necrópsia de um lobo (*Canis lupus*); imagem superior direita: lesões compatíveis com sarna sarcóptica; imagem inferior direita: conteúdo hemorrágico na cavidade torácica.



Figura A4. Exemplar de chapim-rabilongo (*Aegithalos caudatus*) (foto original)

Anexo II

Neste anexo vêm descritas com mais detalhe a análise estatística efetuada através do modelo glm (generalized linear model).

Coeficientes	Estimated	Std. Error	t value	Pr(< t)
Intercepção	$2,083 \times 10^{-04}$	$6,724 \times 10^{-06}$	30,975	$< 2 \times 10^{-16}$
Carga	$8,174 \times 10^{-08}$	$1,439 \times 10^{-08}$	5,680	$3,8 \times 10^{-08}$
Hospedeiro <i>O. cuniculus</i>	$-1,711 \times 10^{-05}$	$8,936 \times 10^{-06}$	-1.914	0,0568
Hospedeiro <i>S. floridanus</i>	$-5,423 \times 10^{-06}$	$6,952 \times 10^{-06}$	-0,780	0,4361

Tabela A1. Análise segundo o modelo glm (generalised linear model) da influência dos factores carga parasitária e hospedeiro sobre a variação do comprimento do corpo nos machos.

Parâmetros de dispersão Gamma para o corpo do macho:

Null deviance: 5,9987

Residual deviance: 5,2971

AIC: 3970,1

Coeficientes	Estimated	Std. Error	t value	Pr(< t)
Intercepção	$9,532 \times 10^{-03}$	$2,214 \times 10^{-04}$	43.047	$< 2 \times 10^{-16}$
Carga	$2,537 \times 10^{-06}$	$5,042 \times 10^{-07}$	5.033	$9,34 \times 10^{-07}$
Hospedeiro <i>O. cuniculus</i>	$1,295 \times 10^{-04}$	$3,127 \times 10^{-04}$	0.414	0.679120
Hospedeiro <i>S. floridanus</i>	$8,913 \times 10^{-04}$	$2,301 \times 10^{-04}$	3.874	0.000137

Tabela A2. Análise segundo o modelo glm (generalised linear model) da influência dos factores carga parasitária e hospedeiro sobre a variação do comprimento do gubernáculo.

Parâmetros de dispersão Gamma para o gubernáculo:

Null deviance: 3,1539

Residual deviance: 2,6153

AIC: 1846,1

Coeficientes	Estimated	Std. Error	t value	Pr(< t)
Intercepção	$5,113 \times 10^{-03}$	$1,086 \times 10^{-04}$	47.065	$< 2 \times 10^{-16}$
Carga	$1,430 \times 10^{-06}$	$2,437 \times 10^{-07}$	5.870	$1,39 \times 10^{-08}$
Hospedeiro <i>O. cuniculus</i>	$1,270 \times 10^{-04}$	$1,544 \times 10^{-04}$	0.823	0.41157
Hospedeiro <i>S. floridanus</i>	$3,618 \times 10^{-04}$	$1,126 \times 10^{-04}$	3.213	0.00149

Tabela A3. Análise segundo o modelo glm (generalised linear model) da influência dos factores carga parasitária e hospedeiro sobre a variação do comprimento da espícula arpão nos machos.

Parâmetros de dispersão Gamma para a espícula arpão:

Null deviance: 2.6567

Residual deviance: 2.2016

AIC: 2136.6

Coeficientes	Estimated	Std. Error	t value	Pr(< t)
Intercepção	4.997e-03	1.073e-04	46.576	< 2e-16
Carga	1.631e-06	2.393e-07	6.816	7.07e-11
Hospedeiro <i>O. cuniculus</i>	3.568e-05	1.515e-04	0.235	0.8141
Hospedeiro <i>S. florianus</i>	2.800e-04	1.111e-04	2.520	0.0124

Tabela A4: Análise segundo o modelo glm (generalised linear model) da influência dos factores carga parasitária e hospedeiro sobre a variação do comprimento da espícula seca nos machos.

Parâmetros de dispersão Gamma para a espícula arpão

Null deviance: 2.7790

Residual deviance: 2.2417

AIC: 2155.4

Coeficientes	Estimated	Std. Error	t value	Pr(< t)
Intercepção	$6,449 \times 10^{-02}$	$3,703 \times 10^{-03}$	17,417	$< 2 \times 10^{-16}$
Carga	$-1,4851 \times 10^{-05}$	$4,930 \times 10^{-06}$	-3,012	0.00284
Hospedeiro <i>L. europaeus</i>	$-4,351 \times 10^{-03}$	$4,513 \times 10^{-03}$	-0,964	0,33590
Hospedeiro <i>S. florianus</i>	$-3,184 \times 10^{-02}$	$3,445 \times 10^{-03}$	-9,243	$< 2 \times 10^{-16}$

Tabela A5: Análise segundo o modelo glm (generalised linear model) da influência dos factores carga parasitária e hospedeiro sobre a variação do número de ovos produzido pela fêmea.

Anexo III

Neste anexo constam dois artigos científicos submetidos a publicação pela revista SOIPA.

Description of the helminth parasitofauna in an isolated population of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Alessandria, Italy.

Tizzani P¹, Ferreira Andrade D.^{1,2}, Silvestri E¹, Ghirardi M¹, Molinar Min A¹, Gualtierio L¹, Peano A¹, Negri E.³, Meneguz PG¹.

¹Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino. ² Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto. ³ Museo Civico di Storia Naturale di Stazzano

AIM: The wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* is a widespread lagomorph in Europe, Australia, South America and some Pacific Islands. This specie prefers a mixed habitat of Mediterranean oak savanna or scrub-forest and open areas (D. Ward 2005. IUCN). There is a bibliographic blank in what concerns to the parasitofauna of the wild rabbit in Italy. Until now, most of the studies refer to the Iberian Peninsula and Macaronesia islands (X. Molina et al., 1999, *Journal of Helminthology*, 73: 221-225; P. Foronda et al., 2003, *Journal of Parasitology*, 89 (5): 952-957) and to the United Kingdom (J.C. Allan et al., 1999, *Journal of Helminthology*, 73: 289-294). The stomach nematode *Graphidium strigosum* is its most common intestinal parasite (J.D. Dunsmore, 1966, *Australian Journal of Zoology*, 14(4) 625-634)). Other nematodes frequently described are *Trichostrongylus retortaeformis* and *Passarulus ambiguus* (P. Foronda et al., 2003, *Journal of Parasitology*, 89 (5): 952-957). One of the few Italian works on sanitary status of wild rabbit was carried out in the province of Turin, Italy (Rossi et al., 1986, *Annali Istituto Superiore di Sanità*, 22 (1): 341-344). It reported one cestode (*Cysticercus pisiformis*), one trematode (*Fasciola hepatica*) and two nematodes (*Graphidium strigosum* and *Trichostrongylus retortaeformis*). The aim of this study was to increase the epidemiological data regarding the parasitofauna of the wild rabbit in Italy.

MATERIALS AND METHODS: The gastrointestinal systems of 10 wild rabbits from the province of Alessandria (Northwestern Italy) were analysed. Usual techniques were used for analysis, collection and preservation of the nematodes (MAFF, 1986, Manual of Veterinary Diagnostic Technics, Ref Book 418). We used the identification key from Skrjabin (Skrjabin et al, 1954, Essential of nematodology, Trichostrongylids of animals and man, 3: 526).

RESULTS AND DISCUSSION: Two nematodes were found: *Obeliscoides cuniculi* was present in 80% of the samples while *Trichostrongylus calcaratus* in 100% (Prevalence, Intensity and Abundance are reported in table 1). No parasites were reported from the large intestine. No one of the parasites previously described in *O. cuniculi* was found. The two species are commonly reported in American lagomorphs (i.e. L.C. Andrews et al, *Journal of Wildlife Diseases* 16 (3): 395-401) and represent a first report for the free ranging European wild rabbit population. Previous studies have demonstrated that *Sylvilagus floridanus* introduced in Italy a great number of exotic parasites among which the two nematodes here reported (Tizzani et al. 2011 *Parasitology Research*, 109(3): 963-966). Considering that i) these exotic nematodes are reported to infect the European hare (Tizzani et al. 2011, *Parasitology Research*, 109(3): 963-966) and ii) in our study area wild rabbits are in sympatry with *S. floridanus* (F. Silvano et al., 2000, *Hystrix*, 11(2): 75-78), it seems that a cross infestation between Eastern cottontail and wild rabbit occur, with an adaptation of those parasites to develop on a new host. Considering our preliminary results, an extinction of the autochthonous wild rabbit gastrointestinal parasites seems to have occurred.

	P	CI_L_95	CI_U_95	I	SD	A	min	max
<i>O. cuniculi</i>	80%	0,55	1,05	62,13	17,99	49,7	8	196
<i>T. calcaratus</i>	100%	1,00	1,00	221,4	72,63	221,4	4	870

Table 1. Prevalence (P), Confidence Interval (CI), Intensity (I), Standard Deviation (SD), Abundance (A) and Range (min-max) of the two nematodes reported.

Coccidian oocysts as stress indicators in restocked *Lepus europaeus* from Western Europe.

Tizzani P¹, Molinar Min A¹, Silvestri E¹, Ferreira Andrade D^{1,3}, Carpignano M², Bessone M¹, Peano A¹, Rossi L¹, Meneguz P.G¹. ¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino. ² Comprensorio Alpino CN3 “Valli Maira e Grana”. ³ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto.

AIM: Between 2012 and 2013 faecal samples were collected from hares *Lepus europaeus* used for restocking operations in the hunting estate CACN3 “Valli Maira e Grana” (Piedmont – Italy). The samples came from free-living hares capture in the Czech Republic. The hare used for restocking operation can remain in cages till to one week; this is extremely stressful and can affect the sanitary status and post release survival. The sanitary status of a released species is a very important parameter that can affect the efficacy of restocking operations (J.M. Black, 1991, *Bird Conservation International*, 1: 329-334). Coccidian load in particular is an effective indicator of stress (K. Chroust, 1984, *Acta Vet. Brno*, 53: 175-182). The aim of this study was to evaluate the welfare and survival probability of hare used in restocking operation through the evaluation of their parasite load with a special focus on coccidia oocysts.

MATERIALS AND METHODS: a total of 96 faecal samples were collected in winter 2012 (55) and winter 2013 (41). They were analysed in the Department of Veterinary Sciences (University of Turin). Standard laboratory techniques were used to recover, collect, store the parasites and both qualitative and quantitative copro microscopic examinations were carried out (MAFF, 1986, Manual of Veterinary Diagnostic Techniques, Ref Book 418). Parasites were identified by using a morphometric approach and through the use of dichotomous keys (N. Aoutil et al, 2005, *Parasite*, 12: 131-144).

RESULTS AND DISCUSSION: Eggs of nematodes such as *Trichuris sp.* and *Trichostrongylus sp.*, as well as oocysts of *Eimeria sp.* were found. Prevalence and abundance of the parasites are shown in table 1. Prevalence of whipworm and trichostrongilids coincide with those reported for wild populations in areas with similar environmental condition (P. Dubinský et al, 2010, *Helminthologia*, 47, 4: 219 – 225). On the contrary coccidia was found with prevalence and abundance significantly higher (K. Chroust, 1984, *Acta Vet. Brno*, 53: 175-182 ; D. Lukesova et al, 2012, *Helminthologia*, 49, 3: 159-163). We recognized 18 species of Coccidia: *E. audubonii*, *E. cabareti*, *E. leporis leporis*, *E. l. brevis*, *E. europaea*, *E. deharroi deharroi*, *E. d. rotunda*, *E. macrosculpta*, *E. orbiculata*, *E. gresae*, *E. baina*, *E. coquelinae*, *E. gantieri*, *E. nicolegerae*, *E. babatica*, *E. reiniai*, *E. stiedai*, *E. tailliezi*. Coccidia are index of low immune competence of the host due to stress condition (H. G. Rödel et al, 2004, *Oecologia*, 140: 566–576). The level of parasitic loads features a strong alteration of healthy condition. This factor could jeopardize the post release survival of the hares (V. Alzaga et al, 2007, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 769–775).

	<i>Trichuris sp.</i>		<i>Trichostrongylus sp.</i>		<i>Eimeria sp.</i>	
Year	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Prevalence	29%	39%	12%	43%	96%	100%
CI_L_95	17%	24%	3%	28%	91%	100%
CI_U_95	41%	54%	21%	58%	101%	100%
Intensity	927,9	471,9	191,4	205,6	77930,6	35402,4
Abundance	274,9	184,1	24,8	90,2	75044,2	35402,4

Table 1. Prevalence, Confidence Interval (CI), Intensity and Abundance of parasitic load in 2012 and 2013.